

Deteksi
white spot syndrome virus (WSSV) - Bagian 2:
Metode nested polymerase chain reaction (PCR)





© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1. Ruang Lingkup	1
2. Acuan Normatif.....	1
3. Istilah dan definisi	1
4. Prinsip umum.....	2
5. Peralatan	2
6. Bahan	3
7. Prosedur.....	3
8. Jaminan mutu	7
Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang.....	3
Tabel 2 – Komposisi koktail PCR	5
Tabel 3 – Program amplifikasi	5
Gambar 1 – Hasil deteksi WSSV.....	6
Lampiran A (Normatif)_Hasil alignment sekuen DNA WSSV.....	8
Lampiran B (informatif)_Pembuatan larutan.....	9
Lampiran C (Informatif)_Metode ekstraksi.....	10
Bibliografi	11

Prakata

Standar deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) - Bagian 2: Metode *nested polymerase chain reaction* (PCR) ini menetapkan metode uji untuk mendeteksi deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dengan menggunakan metode *nested polymerase chain reaction* (PCR), sebagai upaya pencegahan penyebaran penyakit hama dan penyakit ikan/hama penyakit ikan karantina (HPI/HPIK)

Standar ini merupakan revisi dari 7305:2009 tentang Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk identifikasi *white spot syndrome virus* (WSSV) dan *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV). Perubahan pada standar ini dibandingkan dengan SNI sebelumnya meliputi ruang lingkup, acuan normatif dan prosedur. Perubahan didasarkan pada perubahan Manual of diagnostic tests for aquatic animals.oleh Office Internationale Epizooticae (OIE) yang dijadikan sebagai referensi acuan

Standar ini merupakan rangkaian dari standar seri deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) yang memberikan beberapa alternatif metode uji sesuai dengan tingkat teknologi pada masing-masing laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 5 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.

Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan;
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan;
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan;
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia;
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.



Deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) - Bagian 2: Metode *nested polymerase chain reaction* (PCR)

1. Ruang Lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dengan menggunakan metode *nested polymerase chain reaction* (PCR).

2. Acuan Normatif

SNI 7306, *Pengambilan dan pengiriman contoh air dan ikan untuk pemeriksaan penyakit*.

3. Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

3.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

3.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

3.3

denaturasi

pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

3.4

DNA

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

3.5

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

3.6

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari jaringan atau sel

3.7

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

3.8

koktail

mastermix ditambah DNA *template*

3.9**mastermix**

campuran yang terdiri dari DNA polymerase, primer, dNTPs, *buffer* dan DDW

3.10**nested PCR**

suatu teknik PCR dengan metode analisis yang dilakukan dalam dua tahap menggunakan dua set primer

3.11**polymerase chain reaction (PCR)**

suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk menyintesis sekuen DNA tertentu dengan menggunakan primer oligonukleotida yang menempel pada sekuen komplementernya

3.12**pooling contoh uji**

gabungan beberapa contoh uji yang berasal dari 1 (satu) lokasi pengambilan

3.13**template**

sekuen DNA tertentu yang akan diamplifikasi

3.14**white Spot Syndrome Virus (WSSV)**

virus yang termasuk genus *Whispovirus* dalam famili *Nimaviridae*

4. Prinsip umum

Mengisolasi dan memurnikan DNA dari contoh uji yang diduga terinfeksi WSSV untuk dideteksi dengan metode *nested PCR*.

5. Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV
- b) autoklaf;
- c) elektroforesis;
- d) *freezer* (-20 °C);
- e) *heating block* / *waterbath*;
- f) kamera/ peralatan dokumentasi
- g) *laminar air flow*;
- h) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1000 µl;
- i) *minimixer*.
- j) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- k) peralatan bedah, terdiri dari; pinset, gunting, dan pisau bedah;
- l) *rack ice block*;
- m) sentrifus;
- n) minisentrifus;
- o) *thermal cycler*;
- p) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- q) transiluminator UV

6. Bahan

- a) agarosa;
- b) akuades;
- c) *nuclease - free water / double distilled water* (DDW);
- d) etanol 96% (p.a);
- e) etanol 75% (p.a);
- f) kit ekstraksi DNA dengan metode *spin column*;
- g) GelRed™ 10 000 x in water (pewarna DNA);
- h) formula PCR:
 - 5 x PCR *buffer*,
 - MgCl₂ (25 mM),
 - dNTP mix (10 mM),
 - *Taq* DNA polymerase (5 u / µl)
- i) tabung mikro ukuran 200µl ; 500µl ; 1,5 ml – 2 ml;
- j) mikrotip berbagai ukuran antara 10 µl – 1000 µl;
- k) sarung tangan (*powder - free*);
- l) masker;
- m) 0,5x TBE *buffer* (*tris boric* EDTA; 45 mM *tris boric* dan 1 mM EDTA);
- n) 6x *loading dye* mengandung pewarna *bromophenol blue*;
- o) 2 set primer deteksi WSSV 10 µM (OIE, 2015) :
 - 146F1: 5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3'
 - 146R1: 5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3'
 - 146F2: 5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3'
 - 146R2: 5'-TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T-3'

CATATAN 1: bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan.

CATATAN 2: pembuatan larutan diuraikan pada lampiran C

CATATAN 3: bahan pewarna DNA (poin f) dapat menggunakan bahan komersial lain yang sejenis

7. Prosedur

7.1 Persiapan contoh uji

- a) *Pooling* contoh uji

Kelompokkan contoh uji sesuai tabel 1:

Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang

Stadia Udang	Organ Target	Jumlah contoh uji
Telur	Seluruh bagian	>150 Butir
Larva dan pascalarva	Seluruh tubuh	50 ekor - 150 ekor
Tokolan	Seluruh bagian tubuh kecuali bagian kepala	5 ekor
Udang dewasa	<i>Haemolymph</i> kaki renang dan/atau insang otot	5 ekor*

***CATATAN:** untuk contoh uji induk diambil secara individual

- b) Contoh uji / jaringan yang tidak direkomendasikan adalah hepatopankreas, *midgut*, dan mata (OIE, 2015)

7.2 Ekstraksi DNA dengan metode *spin column*

- a) panaskan *elution buffer* pada 70 °C sebelum proses dimulai sampai akan digunakan (langkah butir t);
- b) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- c) tambahkan 200 µl *tissue lysis buffer* dan 40 µl *proteinase K* dan homogenkan;
- d) inkubasi pada 55 °C selama 1 jam;
- e) tambahkan 200 µl *binding buffer* dan homogenkan;
- f) inkubasi pada 70 °C selama 10 menit;
- g) tambahkan 100 µl isopropanol dan homogenkan;
- h) buang bagian sampel yang tidak terlarut dengan mikropipet;
- i) pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan;
- j) sentrifugasi pada 8 000 xg selama 1 menit;
- k) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- l) tambahkan 500 µl *inhibitor removal buffer* ke dalam *filter tube*;
- m) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit;
- n) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- o) tambahkan 500 µl *wash buffer* ke dalam *filter tube*;
- p) ulangi langkah butir m) sampai dengan butir n);
- q) sentrifugasi kembali pada 13 000 x g selama 10 detik;
- r) buang *collection tube*;
- s) pasang kembali *filter tube* dengan tabung mikro 1,5 ml steril (*nuclease - free*);
- t) tambahkan 50 µl - 100 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam *filter tube*;
- u) sentrifugasi pada 8 000 xg selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada tabung mikro merupakan DNA murni;

CATATAN 1: prosedur *spin column* diatas merupakan contoh ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial

CATATAN 2: prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan.

7.3 Pengukuran DNA

- a) Ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- b) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- c) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260} / A_{280});
- d) simpan larutan DNA pada - 20°C apabila tidak langsung digunakan.

CATATAN Prosedur pengukuran DNA disesuaikan dengan alat yang digunakan

7.4 Amplifikasi

- Siapkan DNA *template* dan bahan *mastermix*;
- buat *mastermix* amplifikasi untuk step 1 dan step 2 sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *mastermix* 10 % lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- homogenkan *mastermix* dan distribusikan 23 μ l ke masing-masing tabung mikro 0,2 ml;
- tambahkan 2 μ l *template* DNA contoh uji, kontrol positif, dan kontrol negatif ke dalam *mastermix* step 1;
- lakukan amplifikasi step 1 PCR sesuai Tabel 3;
- ambil 2 μ l produk PCR step 1 lalu masukkan kedalam *mastermix* step 2;
- lakukan amplifikasi step 2 PCR sesuai Tabel 3.

CATATAN: seluruh proses preparasi reagen dan DNA dilakukan di atas es

Tabel 2 – Komposisi koktail PCR

No	Nama Bahan	Volume /reaksi (μ l)	Konsentrasi akhir
1	<i>nuclease-free water</i> /DDW	14,875	
2	5 x PCR Buffer	5	1 x
3	25 mM MgCl ₂	1,5	1,5 mM
4	dNTP <i>mix</i>	0,5	200 μ M
5	Primer 146F1/ 146F2 (10 μ M)	0,5	200 nM
6	Primer 146R1/ 146R2 (10 μ M)	0,5	200 nM
7	<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,125	0,625 U
8	DNA <i>Template</i>	2	10 ng – 100 ng
Total		25	
CATATAN komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan			

Tabel 3 – Program amplifikasi

Proses		Step 1			Step 2		
		Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal		95	5 menit	1	95	5 menit	1
Amplifikasi	Denaturasi	95	30 detik	30	95	30 detik	30
	<i>Annealing</i>	52	30 detik		55	30 detik	35
	Ekstensi	72	1,5 menit		72	1 menit	
Ekstensi akhir		72	5 menit	1	72	5 menit	1

7.5 Elektroforesis

- masukkan gel agarosa 1,5 % ke dalam *chamber* elektroforesis dengan posisi sumur (*well*) pada kutub negatif.
- tambahkan larutan 0,5x TBE *buffer* ke dalamnya hingga gel agarosa terendam.
- tambahkan 5 μ l 6x *loading buffer* kedalam produk PCR (contoh uji, kontrol positif dan kontrol negatif), campur dengan baik.
- ambil sebanyak 5 μ l produk PCR dan DNA *marker* / DNA *ladder* kemudian masukkan kedalam lubang sumur gel agarosa.

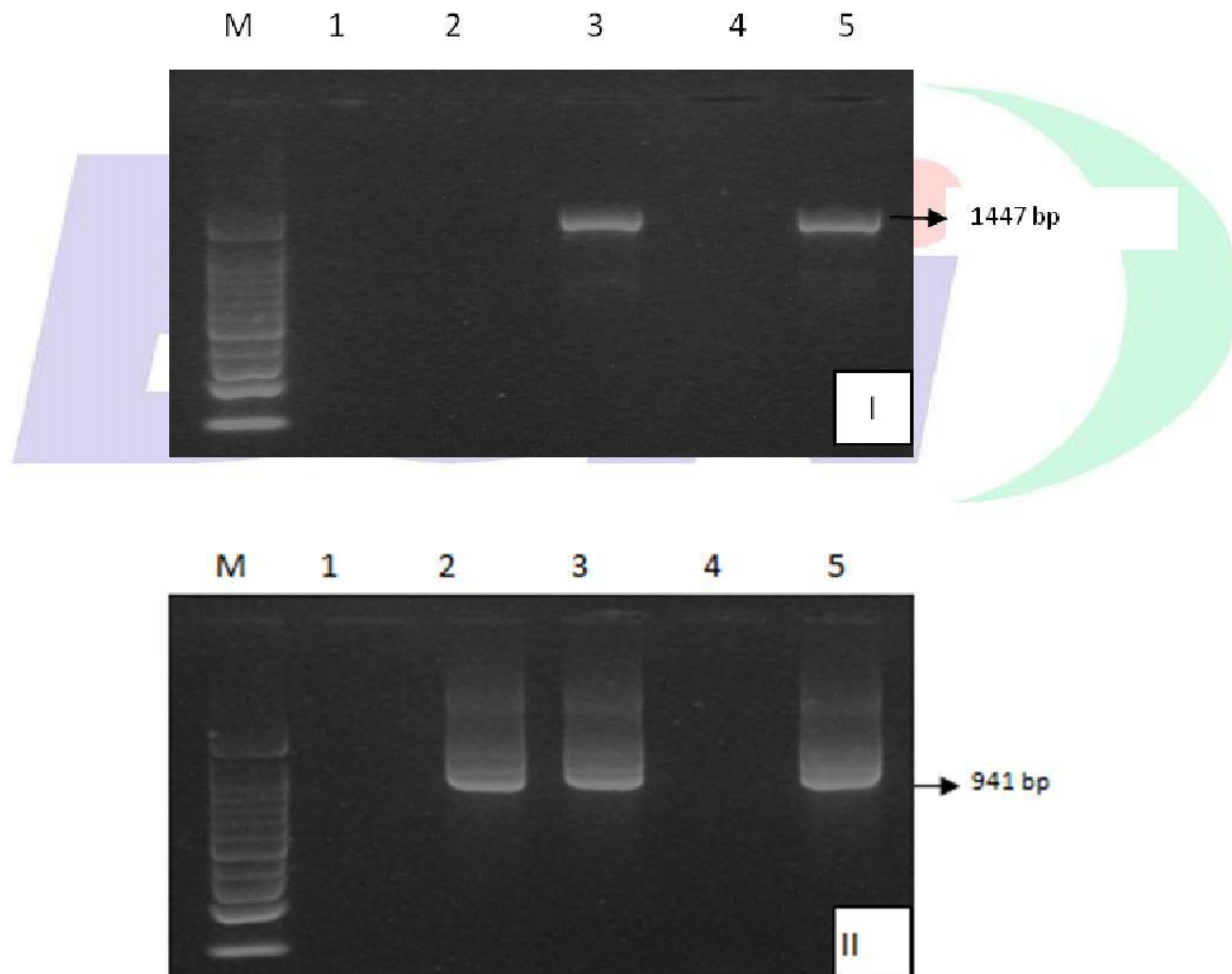
- e) lakukan elektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 volt.
- f) rendam gel agarosa dalam larutan pewarna DNA selama 10 menit.
- g) selanjutnya gel agarosa direndam dalam akuades selama 10 menit untuk menghentikan pewarnaan.
- h) gel agarosa diamati di atas transiluminator UV dan dokumentasikan.

7.6 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita DNA pada gel agarosa setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan transiluminator UV, maka :

- Kontrol positif (DNA WSSV); terlihat adanya pita DNA berukuran 941 bp;
- Kontrol negatif (blanko); tidak terlihat adanya pita DNA berukuran 941 bp;
- Contoh uji positif WSSV terlihat adanya pita DNA berukuran 941 bp;
- Contoh uji negatif WSSV tidak terlihat adanya pita DNA berukuran 941 bp.

CATATAN apabila contoh uji terdeteksi positif pada step 1 (menghasilkan pita DNA berukuran 1447 bp) maka tidak perlu dilanjutkan pada pengujian step 2 (*nested*).



Keterangan :

I. Hasil amplifikasi step 1

II. Hasil amplifikasi step 2

M : DNA *marker* 100bp

1 : Contoh uji A ; negatif WSSV

2 : Contoh uji B ; positif WSSV

3 : Contoh uji C ; positif WSSV

4 : Kontrol negatif WSSV

5 : Kontrol positif WSSV

Gambar 1 – Hasil deteksi WSSV

8. Jaminan mutu

- a) hasil ekstraksi DNA mempunyai A_{260} / A_{280} berkisar antara 1,8 – 2,1;
- b) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.



Lampiran A (Normatif)
Hasil alignment sekuen DNA WSSV
Accession no. AF332093.3

Sekuen DNA WSSV untuk kontrol positif:

ACTACTAACTTCAGCCTATCTAGTAAAACAAGCTAAAAGATTGACGGAGTTGACCCAGCCTTCCCTGC
 CGCCCTCACCTGCGCTTCTCACCTCATGCTTTCTTCCATGGATTCCCATACAAAGTCATCTTTCATGGACAAC
 ATCAAATTGCACATGACTGATACTCAATGCTTCTTCAAGAACATTGAA
 CGATTTGAGAAATTCTTGGGAAGATATGGGGACGAATACGCCATGTCCCACAAGCAAATTTGTAAC TGCCCCCT
 TCCATCTCCACCACACTTTTACTCCCTCAGATAACGAGCATCTGGTATCCTCTTTCGCATTTCGCCGCCGAGC
 AGTCTCCATGGAAGAAATTAGAGCCACACCCTATCAGGCCAACAAGCTTATTAGTGACAAACATTACGTGATG
 AACATGTCCAAGATCGATTCTAGAGTAACAGGATCTTCCCTCCTTAAGAAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGA
 GAATGAAC TCCAAC TTTAATGGAACATTTGAACCATCAAGACTCGCCCTCTCCAAC TCTGGCATGACAACGGC
 AGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAACCAAATAATGCAAGAAGTGTACTAGGAATATTGGAATGTCATCGC
 CAGCACGTGTGCACCGCCGACGCCAAGGGAAC TGTGCTTCAGCCATGCCAGCCGTCTTCCAGGCAACCGATG
 GAAACGGTAACGAATCTGAACTGATCCAGAATGCTCTGCCAAGGAACAGATACATCCAAAAGAGCACAAATGAA
 CGCTCAAAC TGTGCTGTTTGCTAATGTTTTGGAACAAC TATCGCCGATCTTGGAAAGGTTATCGTGAACGAA
 CTGGCCGGCACCATCGCTGAATCTGTACCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAAGGAAATGATTGATAGACTAG
 GCTCTGACGACCTCTTCAAATCTAATAATAATGGAGGAGTAGAATCAATGGATTATGAAGATAGCGAAACAAC
 ATCCAACAATGGTCCCGTCCTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAG
 GCAGCTCGCCCGGAAAATGTACCATTCGCCTCATGCGCCAGCGGCCCTCTCGCCTTTGATTTCTTCTGTCAA
 AGGGAGATACATTCTGAAGAAAAGAACGCCGAACAAGGTGCAGCAGCTGCCGTATCCTCTACCTATTCTTCCTC
 TTCTAACACTACTCTTCGTAAGCATTTGGCTCGAGTTTTCGAAGCCATCTCTAAGCAAGTAACTGATGCTGAA
 TTCAAGGATATCCTCAACGATATCGAACGTAATATTTCTTCTGACTATACTAACTGTCCACCAAATACTAACC
 AAAATGCCTTTGCTCTAGCTATCAAGAGAGAATCAGCAGAATTGTTTCCTTCTTAACCATTCT**TCGTAAGA**
ACATTACACCCGCATTA

Keterangan: sekuen yang digarisbawahi merupakan posisi primer WSSV

Lampiran B (informatif) Pembuatan larutan

B.1 Larutan GelRed™ 3x in water (pewarna DNA)

Cara membuat :

- tambahkan 30 µl stok GelRed™ (10000x) pada 100 ml akuades kemudian aduk sampai homogen;
- tempatkan GelRed™ 3x in water pada wadah yang terbuat dari *polypropylene* atau plastik;
- simpan pada 25 °C dan di tempat yang terhindar dari cahaya.

B.2 Gel agarosa 1,5 %

Cara membuat :

- larutkan 1,5 g agarosa dalam 100 ml larutan buffer TBE / TAE 1x;
- didihkan hingga larutan menjadi bening;
- tuang gel agarosa setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel agarosa yang telah dipasang sisir;
- tunggu sampai gel agarosa mengeras dan siap digunakan.

B.3 5x Tris Boric EDTA (TBE) Buffer

Cara membuat:

- buat larutan stok TBE 5x dengan menimbang 54 g *tris base*, 27,5 g asam borat dan 20 ml 0,5M EDTA.
- masukkan semua bahan ke dalam botol kaca tahan panas berkapasitas 1 000 ml.
- tambahkan akuades sampai dengan volume 1000 ml.
- larutkan bahan dengan menggunakan stirer magnetik sampai tercampur rata.
- sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.
- untuk membuat larutan siap pakai (larutan kerja) TBE 0,5x, larutkan 1 bagian stok dengan 9 bagian akuades.

Lampiran C (Informatif) Metode ekstraksi

C.1 Metode presipitasi

- a) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 1 000 μ l larutan ekstraksi DNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pestle*;
- c) sentrifugasi pada 10 000 x g selama 10 menit;
- d) pindahkan supernatan ke tabung mikro baru yang telah diisi 500 μ l etanol 96%;
- e) kocok tabung mikro secara perlahan, diamkan selama 1 menit;
- f) sentrifugasi pada 4 000 x g selama 1 menit;
- g) buang cairan, cuci *pellet* dengan 1 000 μ l etanol 75 %, diamkan selama 1 menit;
- h) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
cuci kembali *pellet* dengan 1 000 μ l etanol 75 %, diamkan *selama* 1 menit;
- i) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
- j) tambahkan DDW sebanyak 100 μ l - 200 μ l dan homogenkan;



Bibliografi

- [1] OIE. 2015. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 2.2.6.White Spot Disease*
- [2] Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. New York.

